2/5/1

DIALOG(R)File 351:Derwent WPI

(c) 2006 Thomson Derwent. All rts. reserv.

011875173 **Image available**
WPI Acc No: 1998-292083/ **199826**
XRAM Acc No: C98-090789

Novel compounds B-5354a, B-5354b and B-5354c used as e.g. immunosuppressants - are produced by culturing bacterium SANK 71896 and recovering the product from the medium

Patent Assignee: SANKYO CO LTD (SANY)
Number of Countries: 001 Number of Patents: 001
Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week	
JP 10101630	A	19980421	JP 96259446	A	19960930	199826	B

Priority Applications (No Type Date): JP 96259446 A 19960930
Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
JP 10101630	A		7	C07C-229/64	

Abstract (Basic): JP 10101630 A

Novel compounds B-5354a of formula (I), B-5354b of formula (II) and B-5354c of formula (III), and their salts are new. Also claimed is the strain SANK 71896 (FERM BP-5356) able to produce (I), (II) and/or (III).

(I), (II) and/or (III) are prepared by culturing a bacterium having ability to produce (I), (II) and/or (III), and collecting the product from the cultured (claimed).

USE - (I)-(III) are useful as medicines, especially sphingosine-kinase inhibitors. They are useful for prevention or treatment of arteriosclerosis, diabetes, thrombosis, inflammation, cancer, cancer metastasis, restenosis after PTCA, and as immunosuppressants.

Dwg.0/0

Title Terms: NOVEL; COMPOUND; IMMUNOSUPPRESSIVE; PRODUCE; CULTURE; BACTERIUM; RECOVER; PRODUCT; MEDIUM
Derwent Class: B05; D16
International Patent Class (Main): C07C-229/64
International Patent Class (Additional): A61K-031/245; C12N-009/99
File Segment: CPI

(19)日本国特許庁（ＪＰ）　(12) **公開特許公報**（Ａ）　(11)特許出願公開番号

特開平10－101630

(43)公開日　平成10年(1998) 4月21日

(51)Int.Cl.⁶	識別記号	ＦＩ	
Ｃ０７Ｃ 229/64		Ｃ０７Ｃ 229/64	
Ａ６１Ｋ 31/245	ＡＢＸ	Ａ６１Ｋ 31/245	ＡＢＸ
	ＡＤＰ		ＡＤＰ
	ＡＤＳ		ＡＤＳ
	ＡＤＵ		ＡＤＵ

審査請求　未請求　請求項の数６　ＯＬ　（全 ９ 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願平8－259446

(22)出願日　平成８年(1996) ９月30日

(71)出願人　000001856
三共株式会社
東京都中央区日本橋本町３丁目５番１号

(72)発明者　田中　勝弘
東京都品川区広町１丁目２番58号　三共株式会社内

(72)発明者　河野　圭太
東京都品川区広町１丁目２番58号　三共株式会社内

(72)発明者　水野　賢善
茨城県つくば市御幸が丘33　三共株式会社内

(74)代理人　弁理士　大野　彰夫　（外２名）

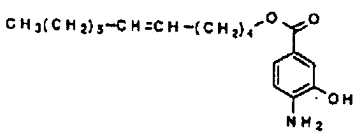
(54)【発明の名称】　新規化合物Ｂ－5354ａ、Ｂ－5354ｂ及びＢ－5354ｃ

(57)【要約】

【課題】本発明の課題は、抗動脈硬化剤、抗糖尿病剤、抗血栓剤、抗炎症剤、免疫抑制剤、制癌剤、癌転移抑制剤、経皮的冠動脈形成術(PTCA)後の再狭窄等の予防または治療剤として有用である、スフィンゴシンキナーゼに対する特異的な阻害剤の提供である。

【解決手段】本発明は、下記式(I) で表される新規化合物 B-5354aおよびその塩：

【化１】



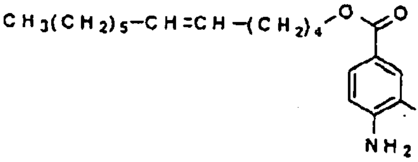
(I)

等に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項１】下記式(I) で表される新規化合物 B-5354a およびその塩：

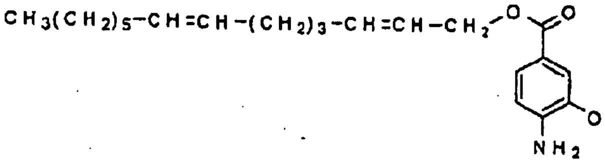
【化１】



(I)

【請求項２】下記式(II)で表される新規化合物 B-5354b およびその塩：

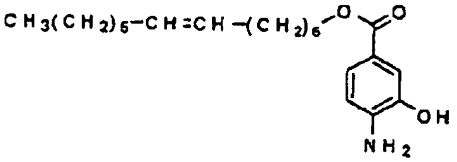
【化２】



(II)

【請求項３】下記式(III) で表される新規化合物 B-5354cおよびその塩：

【化３】



(III)

【請求項４】B-5354a 、B-5354b 及び／またはB-5354c の生産能を有する菌を培養し、その培養物よりB-5354a 、B-5354b 及び／またはB-5354c を採取することを特徴とするB-5354a 、B-5354b 及び／またはB-5354c の製造法。

【請求項５】B-5354a 、B-5354b 及び／またはB-5354c の生産能を有する菌がSANK 71896株 (FERM BP-5356) である請求項４記載の製造法。

【請求項６】SANK 71896株 (FERM BP-5356)。

【発明の詳細な説明】

【０００１】

【発明の属する技術分野】本発明は、医薬、殊にスフィンゴシンキナーゼ阻害剤として有用な新規化合物B-5354a 、B-5354b 及びB-5354c 並びにそれらの製造法に関する。

【０００２】

【従来の技術】スフィンゴ脂質は従来、グリセロリン脂質およびコレステロールとならぶ細胞膜の主要な構成成分の一つと考えられてきた。グリセロリン脂質は細胞膜構造の維持だけでなく、その代謝産物として多くの生理活性物質を産生させることが知られてきた。しかし、スフィンゴ脂質についてはその代謝産物の生理活性については最近までほとんど知られていなかった。近年、セラミドなどのさまざまなスフィンゴ脂質の代謝産物にアポトーシスの誘導や細胞増殖刺激作用などの生理活性が知られる様になり、スフィンゴ脂質の代謝酵素が生理的反応や種々の病態の原因に密接に関連する可能性が示唆されるようになった (Hannun Y. A. and Obeid L. M., (1995) TIBS, 20, 73-77参照)。

【０００３】スフィンゴ脂質の代謝酵素には、細胞膜の主要な構成成分であるスフィンゴミエリンを中心として、その生合成にはたらくもの、分解に働くもの、さらにガングリオシドなどの糖脂質の合成、分解に働くものなど、さまざまな酵素が知られている。スフィンゴシンキナーゼは、スフィンゴ脂質の分解系に作用する酵素であり、スフィンゴシンをリン酸化し　スフィンゴシン-1 - リン酸を生成させる酵素である。本酵素の基質や生成物であるスフィンゴシンやスフィンゴシン-1- リン酸についてもまた、最近多くの生理活性が報告されるようになった。

【０００４】基質であるスフィンゴシンについてはプロテインキナーゼＣ（以下、「ＰＫＣ」と略称する。）を阻害することが知られており、ＰＫＣの活性化剤であるホルボールエステルの作用を多くの細胞系で打ち消すことが明らかになっている。たとえば、ホルボールエステルにより引き起こされた血小板凝集や、好中球の活性化、白血病細胞の分化などがスフィンゴシンにより抑制される (Hannun Y. A. and Corinne M. L., (1993) Biochimica et Biophysica Acta, 1154, 223-236 参照)。

【０００５】またスフィンゴシンはその他種々の情報伝達経路に対して作用することも知られている (Hannun Y. A. and Corinne M. L., (1993) Biochimica et Biop hysica Acta, 1154, 223-236 参照）。これらの情報伝達経路は癌の進展、免疫、炎症、糖代謝、血液凝固などの反応に密接に関連することが知られている。

【０００６】また、ある種の白血病細胞においては、網膜芽腫遺伝子産物（retinoblastomagene product)を介する増殖抑制経路を、スフィンゴシンが活性化することが知られている。スフィンゴシンのこの作用はＰＫＣの阻害作用とは無関係であり、網膜芽腫遺伝子産物を脱燐酸化して活性化し、細胞を細胞周期のG0/G1 期に留めることにより、白血病細胞の増殖を抑制する（Hannun Y. A. and Corinne M. L., (1993) Biochimica et Biophysica Acta, 1154, 223-236 参照）。

【０００７】一方、スフィンゴシン-1- リン酸には、繊維芽細胞に対して増殖刺激作用が認められる。血小板増殖因子（以下「PDGF」と略称する。）や血清の繊維芽細胞増殖刺激作用は、セカンドメッセンジャーとしてのスフィンゴシン-1- リン酸の作用を介したものであることが最近明らかになった（Olivera A. and Spiegel S., (1993) Nature , 365, 557-560 およびSpiegel S. et al, (1994) Breast Cancer Research and Treatment 31, 337-348 参照）。本作用もＰＫＣの阻害作用とは無関係と考えられている。繊維芽細胞以外の細胞では平滑筋細胞において、スフィンゴシンが細胞増殖作用を示すことが知られており（Yacobs L. S. and Kester M., (1993) Am. J. Physiol., 265, C740-C747 参照）、繊維芽細胞と同様の作用機作で細胞増殖が調節されていることが示唆される。

【０００８】またスフィンゴシン-1- リン酸は、ヒト血小板中に多く含まれ、トロンビンやコラーゲン刺激による血小板活性化の際に血小板外に放出され、血小板の凝集反応をさらに活性化することが最近になって明らかとなった（Yatomi Y. et al., (1995) Blood, 86, 193-202 参照）。

【０００９】スフィンゴシン-1- リン酸のその他の作用としては、ホスホリパーゼ D の活性化、細胞内カルシウムイオンプールからのカルシウムイオン放出の促進〔Spiegel S. et al, (1994) Breast Cancer Research and Treatment 31, 337-348参照）、癌細胞の細胞運動とファゴキネシス(phagokinesis)の抑制（Hannun Y. A. and Corinne M. L., (1993) Biochimica et Biophysica Acta, 1154, 223-236 参照）などが知られている。

【００１０】以上のごとく、スフィンゴシンやスフィンゴシン-1- リン酸はさまざまな生理作用を有しており、多くの病態において細胞レベルでのスフィンゴシン－１－リン酸量を調節をする物質は有用な薬理作用を有する。

【００１１】たとえばPDGFは、血管平滑筋細胞の増殖と遊走を刺激することを介して血管病変の進展に重要な役割を果たすと考えられているが、該作用機作においてスフィンゴシン-1- リン酸がセカンドメッセンジャーとして働くと考えられている。従って、そのシグナルを遮断すれば、高脂血症における動脈硬化症、糖尿病性血管障害、経皮的冠動脈形成術(PTCA)後の再狭窄等の予防または治療に有用と考えられる。

【００１２】また、スフィンゴシン-1- リン酸に血小板活性化作用が報告されていることから、その生成を妨げれば心疾患など血栓形成を原因とするさまざまな疾患の予防または治療に有用と考えられる。

【００１３】さらに、最近、セリンパルミトイルトランスフェラーゼ(serine palmitoyl transferase)に対する微生物由来の阻害剤がスフィンゴシンに良く似た構造を持ち、しかも強力な免疫抑制作用を持つことが報告された（Sasaki S. et al, (1994) J Antibiotics, 47, 420-433 およびMiyake Y. et al., (1995) Biochem. Biophys. Res. Comm., 211, 396-403 参照）。スフィンゴシンもセリンパルミトイルトランスフェラーゼのダウンレギュレーション作用を有する（Hannun Y. A. and Corinne M. L., (1993) Biochimica et Biophysica Acta, 1154, 223-236参照）ことから、スフィンゴシンキナーゼの阻害剤は新たな免疫抑制剤のターゲットになる可能性も考えられる。

【００１４】スフィンゴシンやスフィンゴシン-1- リン酸は各種癌細胞に対して、その増殖や遊走に作用することが報告されている（Spiegel S. et al, (1994) Breast Cancer Research and Treatment 31, 337-348参照）。癌細胞の種類や条件によって成績はさまざまではあるが、癌の種類によってはスフィンゴシンキナーゼの阻害剤が制癌や転移の阻止に働く可能性も考えられる。

【００１５】以上のことから、スフィンゴシンキナーゼに対する特異的な阻害剤は、抗動脈硬化剤、抗糖尿病剤、抗血栓剤、抗炎症剤、免疫抑制剤、制癌剤、癌転移抑制剤、経皮的冠動脈形成術(PTCA)後の再狭窄等の予防または治療剤としての開発が可能である。

【００１６】現在、スフィンゴシンキナーゼの阻害剤として知られている物質には、スフィンゴシンの構造類似物質であるジヒドロスフィンゴシンやジメチルスフィンゴシンなどが知られているがその阻害に必要な濃度はそれぞれ20μM 、50μM であり（Bornfeldt K. E., et al, (1995) J Cell Biol., 130, 193-206 および Spiegel S. et al, (1994) Breast Cancer Research and Treatment 31, 337-348 参照）、また細胞内で代謝されることも十分考えられるため、強力かつ特異的な阻害剤とはいいがたい。また、薬剤としての体内への吸収性や血中での安定性においても問題点が多いと考えられる。このような観点から、スフィンゴシンキナーゼに対して特異的な阻害を示し、かつ新規構造を有する生理活性物質が望まれている。

【００１７】

【発明が解決しようとする課題】本発明者らは、微生物二次代謝産物中よりスフィンゴシンキナーゼ阻害作用を

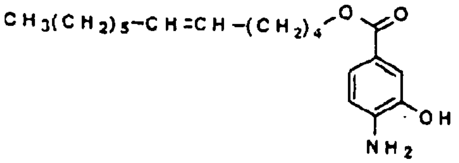
もつ物質を検索し、茨城県ひたちなか市平磯で採集した海水中から分離した新規な海洋細菌SANK71896 株（FERM BP-5356）の培養物から、スフィンゴシンキナーゼに対する阻害作用を有する新規化合物 B-5354a、B-5354b 及びB-5354c が生産されることを見出し、本発明を完成した。

【0018】

【課題を解決するための手段】本発明は、（1）下記式(I) で表される新規化合物 B-5354aおよびその塩：

【0019】

【化4】

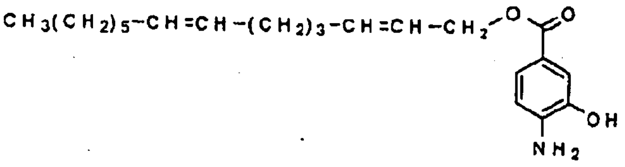


(I)

【0020】（2）下記式(II)で表される新規化合物 B-5354bおよびその塩：

【0021】

【化5】

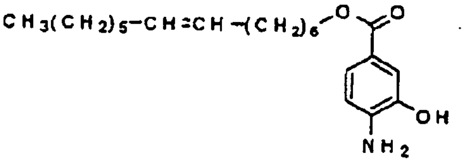


(II)

【0022】（3）下記式(III) で表される新規化合物 B-5354cおよびその塩：

【0023】

【化6】



(III)

【0024】（4）B-5354a 、B-5354b 及び／またはB-5354c の生産能を有する菌を培養し、その培養物よりB-5354a 、B-5354b 及び／またはB-5354c を採取することを特徴とするB-5354a 、B-5354b 及び／またはB-5354c の製造法、（5）B-5354a 、B-5354b 及び／またはB-5354c の生産能を有する菌がSANK 71896株（FERM BP-5356）である（4）記載の製造法、（6）SANK 71896株 (FERM BP-5356)に関する。

【0025】本発明のB-5354a 、B-5354b 及びB-5354c は下記の物理化学的性状を有する。

【0026】B-5354a

1） 性質；白色粉末

2） 溶解性；メタノール、酢酸エチル、クロロホルム、ジメチルスルホキシドなどの有機溶媒に可溶

3） 呈色試験；50% 硫酸、ヨウ素で陽性

4） 分子式； $C_{19}H_{29}NO_3$

5） 分子量；319 （高分解能FAB-MS法により 観測値：$[M]^+$ 319.2122 ）（計算値：319.2147）

6） 紫外線吸収スペクトル；メタノール中、205 nm（ε 16100), 229 nm（ ε 10200), 281 nm（ ε 9200), 309 nm（ε 12700)

7） ^{1}H- 核磁気共鳴スペクトル；（ 重メタノール中 ：ppm, TMS 基準)7.36(1H, dd, J=8, 2Hz), 7.33(1H, d, J=2Hz), 6.67(1H, d, J=8Hz), 5.43-5.33(2H, m), 4.22(2H, t, J=6.5Hz) , 2.12(2H, m), 2.04(2H, m), 1.75(2H, m),1.51(2H, m), 1.38-1.21(8H, m), 0.88(3H, t, J=6.7Hz)

8） ^{13}C- 核磁気共鳴スペクトル；（ 重メタノール中 ：ppm, 重メタノール基準)166.7(s),142.6(s),141.0(s),129.1(d),128.0(d),121.8(d),117.4(s),113.7(d),112.3(d),63.0(t),30.6(t),28.5(t),27.7(t),27.2(t),25.9(t),25.4(t),25.0(t),21.4(t),12.1(q)

9） 高速液体クロマトグラフグラフィー

保持時間 ： 5.0分

カラム ：ナカライ・テスク社製COSMOSIL 5C18AR, 4.6φX150mm

溶媒 ： アセトニトリル － 水 8:2

流速 ： 1ml／分

検出 ： UV 210nm

B-5354b

1） 性質；白色粉末

2） 溶解性；メタノール、酢酸エチル、クロロホルム、ジメチルスルホキシドなどの有機溶媒に可溶

3） 呈色試験；50% 硫酸、ヨウ素で陽性

4） 分子式； $C_{21}H_{31}NO_3$

5） 分子量；345 （高分解能FAB-MS法により 観測値：$[M]^+$ 345.2284 ）（計算値：345.2304）

6） 紫外線吸収スペクトル；メタノール中203 nm（ε 16600), 229 nm（ ε 10000), 283 nm（ ε 8800), 309 nm（ε 12200)

7) ^{1}H-核磁気共鳴スペクトル；(重メタノール中 : ppm, TMS 基準)7.37(1H, dd, J=8, 2Hz), 7.33(1H, d, J=2Hz), 6.67(1H, d, J=8Hz), 5.84(1H,m), 5.67(1H, m), 5.40-5.30(2H, m), 4.66(2H, dd, J=6, 0.9Hz) , 2.14-1.97(6H, m), 1.47(2H, m), 1.36-1.21(8H, m), 0.88(3H, t, J=7.2Hz)

8) ^{13}C- 核磁気共鳴スペクトル；(重メタノール中 : ppm, 重メタノール基準)166.4(s),142.6(s),141.0(s),134.3(d),129.0(d),128.0(d),123.7(d),121.9(d),117.3(s),113.8(d),112.2(d),63.7(t),30.6(t),30.4(t),28.5(t),27.8(t),27.7(t),25.9(t),25.2(t),21.4(t),12.1(q)

9) 高速液体クロマトグラフグラフィー

保持時間 : 6.8分

カラム :ナカライ・テスク社製 COSMOSIL 5C18AR, 4.6φX150mm

溶媒 : アセトニトリル - 水 8:2

流速 : 1ml／分

検出 : UV 210nm

B-5354c

1) 性質；白色粉末

2) 溶解性；メタノール、酢酸エチル、クロロホルム、ジメチルスルホキシドなどの有機溶媒に可溶

3) 呈色試験；50% 硫酸、ヨウ素で陽性

4) 分子式； $C_{21}H_{33}NO_3$

5) 分子量；347 （高分解能FAB-MS法により 観測値：[M]$^+$ 347.2436 ） （計算値：347.2460)

6) 紫外線吸収スペクトル；メタノール中203 nm (ε 16300), 229 nm (ε 9700), 281 nm (ε 8500), 309 nm (ε 11800)

7) 赤外線吸収スペクトル；3490, 3400, 3350, 2955, 2920, 2850, 1680, 1615, 1450, 1310, 1290, 1230, 1120, 765 cm^{-1}

8) ^{1}H-核磁気共鳴スペクトル；(重ジメチルスルホキシド中 : ppm, TMS 基準)9.37(1H, s), 7.26(1H, d, J=1.5Hz), 7.25(1H, dd, J=8, 1.5Hz), 6.59(1H, d,J=8Hz), 5.40-5.30(2H, m), 4.14(2H, t, J=6.5Hz) , 2.0(4H, m), 1.65(2H, m), 1.44-1.21(14H, m), 0.86(3H, t, J=7Hz)

9) ^{13}C- 核磁気共鳴スペクトル；(重ジメチルスルホキシド中 : ppm, 重ジメチルスルホキシド基準)166.0(s), 142.8(s),142.3(s),129.7(d),129.6(d),122.4(d),116.6(s),114.5(d),112.5(d),63.5(t),31.1(t),29.1(t),29.0(t),28.4(t),28.3(t),28.3(t),26.6(t),26.5(t),25.4(t),22.1(t),13.9(q)

10) 高速液体クロマトグラフグラフィー

保持時間 : 5.9分

カラム :ナカライ・テスク社製 COSMOSIL 5C18AR, 4.6φX150mm

溶媒 : アセトニトリル - 水 17:3

流速 : 1ml／分

検出 : UV 210nm

本発明のB-5354a 、B-5354b 及びB-5354c は１または２個の二重結合を有し、それゆえ種々の幾何異性体が存在する。本発明においては、これらのB-5354a 、B-5354b 及びB-5354c がすべて単一の式で示されているが、本発明は、これらの異性体及びこれらの異性体の混合物をすべて含むものである。

【００２７】本発明のB-5354a 、B-5354b 及びB-5354c は、当業者に周知の方法を用いて塩にすることができる。本発明は、そのようなB-5354a 、B-5354b 及びB-5354c の塩も包含する。B-5354a 、B-5354b 及びB-5354c の塩としては、医学的に使用され、薬理学的に許容されるものであれば特に限定はない。なお、B-5354a 、B-5354b 及びB-5354c の塩が、医薬以外の用途に用いられる場合、例えば中間体として用いられる場合にはなんら限定はない。そのような塩としては、好適にはナトリウム塩、カリウム塩、リチウム塩のようなアルカリ金属塩；カルシウム塩、マグネシウム塩のようなアルカリ土類金属塩；アルミニウム塩、鉄塩、亜鉛塩、銅塩、ニッケル塩、コバルト塩などの金属塩；アンモニウム塩のような無機塩、t-オクチルアミン塩、ジベンジルアミン塩、モルホリン塩、グルコサミン塩、フェニルグリシンアルキルエステル塩、エチレンジアミン塩、N-メチルグルカミン塩、グアニジン塩、ジエチルアミン塩、トリエチルアミン塩、ジシクロヘキシルアミン塩、N,N'- ジベンジルエチレンジアミン塩、クロロプロカイン塩、プロカイン塩、ジエタノールアミン塩、N-ベンジル－フェネチルアミン塩、ピペラジン塩、テトラメチルアンモニウム塩、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン塩のような有機塩などのアミン塩；弗化水素酸塩、塩酸塩、臭化水素酸塩、沃化水素酸塩のようなハロゲン化水素酸塩；硝酸塩、過塩素酸塩、硫酸塩、燐酸塩などの無機酸塩；メタンスルホン酸塩、トリフルオロメタンスルホン酸塩、エタンスルホン酸塩のような低級アルカンスルホン酸塩；ベンゼンスルホン酸塩、ｐ－トルエンスルホン酸塩のようなアリールスルホン酸塩、酢酸、リンゴ酸、フマール酸塩、コハク酸塩、クエン酸塩、酒石酸塩、シュウ酸塩、マレイン酸塩のような有機酸塩；及び、グリシン塩、リジン塩、アルギニン塩、オリニチン塩、グルタミン酸塩、アスパラギン酸塩のようなアミノ酸塩を挙げることが出来る。また、本発明のB-5354a 、B-5354b 及びB-5354c は、溶剤和物となることがある。大気中に放置したり、または、再結晶をすることにより、水分を吸収し、吸着水が付いたり、水和物となる場合があり、その様な溶剤和物も本発明に包含される。

【００２８】さらに、本発明は、生体内において代謝されB-5354a 、B-5354b 及び／またはB-5354c に変換される化合物、いわゆるプロドラッグもすべて含むものである。

【0029】

【発明の実施の形態】

B-5354a 、B-5354b 及び／またはB-5354c の生産菌の性状

本発明で用いられる新規な海洋細菌SANK 71896株の形態学的、生理学的性状および化学分類学的性状は以下に示した通りである。

【0030】1．形態学的性状

マリンアガー(ディフコ社製) 上で23℃、24時間培養後の観察では、細胞は直径0.7 ～0.9 μm 、長さ1.3 ～2.0 μm の桿菌で長い多極毛を有し、運動する。また、グラム染色は陰性であり、胞子を形成しない。

【0031】2．マリンアガー上での生育状態

23℃、48時間培養したコロニーは、不透明なうすい枯草色で円形、全縁でありコロニー表面の形状は平滑、かつ偏平である。水溶性の色素を生成しない。

【0032】3．生理学的性状

1) 海水の要求性、(プロテオースペプトンNo.3(ディフコ社製)0.1% 、酵母エキス(ディフコ社製)0.1% 、ファイトンペプトン0.05%(ビービーエル社製) の組成の培地を用いた場合) ：生育に海水を要求する。

【0033】2) O-F(オキシダティブ － ファーメンタティブ) テスト、OFベサルメディウム(ディフコ社製) 、1% グルコース添加(75%人工海水で調整) ：グルコースから酸を生成しない。

【0034】3) カタラーゼ：＋

4) 硝酸塩の還元：－

5) 酸素に対する挙動：好気的

6) でんぷんの加水分解：－

7) 寒天の分解：－

8) ゼラチンの液化：＋

9) V-Pテスト：－

10) インドールの生成：－

11) 生育温度：18℃～37℃の範囲で良好な生育を示し9～41℃で生育可能。

【0035】12) 栄養要求性(プロカリオテス(The prokaryotes) 、3 巻(1992 年) 、3049頁記載の基礎培地を用いた場合) ：酵母エキスを要求する。)

13) 炭素源の利用 (12)で示した、酵母エキスを含む基礎培地を用いた場合)

グルコース	＋
D-キシロース	＋
L-アラビノース	－
麦芽糖	－
ショ糖	－
グリセロール	＋
酢酸	－
コハク酸	＋
メタノール	－

4．化学分類学的性状

1) G+C 含量：59.9%(HPLC法)

2) キノン系：ユビキノンQ-10

3) 細胞膜構成成分中のスフィンゴリピトの有無：－

以上の菌学的性状を有するSANK 71896の同定をノエル アール．クリーグ(Noel R. Krieg) 編、バージーズマニュアル オブ システマティック バクテリオロジー(Bergey's Manual of Systematic Bacteriology)1 巻(1984 年) やピー.シィガーズ(P. Segers) らの報告、インターナショナル ジャーナル オブ システマティク バクテリオロジー (International Journal of Systematic Bacteriology)44 巻、499-510 頁(1994 年) にもとづき行った。SANK 71896株は、多極毛を有するグラム陰性の桿菌であり、G+C 含量は59.9% である。このような性状を持つSANK 71896株に近い細菌としてはブレヴディモナス (Brevundimonas)属, スフィンゴモナス(Sphingomonas)属、リゾモナス(Rhizomonas)属、シュードモナス(Pseudomonas) 属、ブルクホリデリア(Burkholderia)属、カウロバクター (Caulobacter)属やコマモナダアシア科(Comanonadaceae)科があげられる。しかし、SANK 71896株はブレヴディモナス属が短い鞭毛でG+C 含量が65～68% であることからこの属とは異なる。またSANK 71896株はスフィンゴモナス属やリゾモナス属とはスフィンゴリピドの有無の点で異なる。SANK 71896株はシュードモナス属のユビキノン系がQ-9 、コマモナダアシア科のユビキノン系がQ-8 であることからこれらとは異なる。SANK 71896株はブルクホリダリア属のG+C 含量が64-68%、ユビキノン系がQ-8 であることからこの属とは異なる。また、SANK 71896株は有柄細菌であるカウロバター属とは形態学的に異なる。従って、本菌を既存の分類群に含めることは困難であり、本発明者らはSANK 71896株を新規な海洋細菌とした。SANK 71896株は工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM BP-5636として寄託されている(原寄託日：平成8 年8 月27日) 。

【0036】培養法及び精製法

本発明の新分離株を培養するのに際し使用される培地としては炭素源、窒素源、無機イオンおよび有機栄養源より選択されたものを適宜含有する培地であれば合成又は天然の何れでも使用可能であるが、海水で製作することが必要である。B-5354a 、B-5354b 及び／またはB-5354c はSANK 71896株を適当な培地で培養し、それから採取する事によって得られる。栄養源としては、従来細菌類の菌株の培養に利用されている公知のものが利用できる。例えば、炭素源としては、グルコース、グリセロール、コハク酸ソーダ、糖蜜などが使用できる。また、窒素源としてはバクトペプトンなどのペプトン類、コーンスティープリカー、生イースト、硫酸アンモニウム、硝酸ナトリウムなどを使用しうる。このほか必要に応じて炭酸カルシウム等の無機塩類を添加するほか、菌株の発育を助け、B-5354a 、B-5354b 及び／またはB-5354c の生産を促進するような有機及び無機物を適当に添加する

ことができる。培養法としては、一般の抗生物質を生産する方法と同じく液体培養法、特に深部培養法が適している。培養は好気的条件で行われ、培養に適当な温度は、20～27℃であるが、多くの場合23℃付近で培養する。B-5354a、B-5354b 及び／またはB-5354c の生産は、振盪培養で通常3-4 日で最高値に達する。 培養終了後、培養液中の菌体あるいは上清中に存在するB-5354a 、B-5354b 及び／またはB-5354c を培養液の容量程度のアセトンあるいはアセトニトリルのような有機溶媒を添加し混合することにより抽出する。抽出物中に存在する固形部分を珪藻土をろ過操作助剤とするろ過操作または遠心分離によって分別し、そのろ液または上清中に存在するB-5354a 、B-5354b 及び／またはB-5354c を、スフィンゴシンキナーゼ活性を指標にして、その物理的性状を利用し抽出精製する。例えば、この抽出液中に存在するB-5354a 、B-5354b 及び／またはB-5354c は、まず濃縮操作で混在する有機溶媒を除去した後にpH3 程度の酸性条件下で水と混和しない有機溶剤、例えばn-ブタノール、メチルエチルケトン、酢酸エチル、クロロホルム、塩化エチレン、塩化メチレンなどの単独または、それらの組み合わせにより抽出精製することができる。あるいは吸着剤として、例えば活性炭または吸着用樹脂であるアンバーライトXAD-2 、XAD-4 （ローム アンド ハース社製）などや、ダイヤイオンHP-10 、HP-20 、CHP-20P 、HP-50 （三菱化成（株）製）などを使用することができる。B-5354a 、B-5354b 及び／またはB-5354c を含む液を上記のごとき吸着剤の層を通過させて不純物を吸着させて取り除くか、またはB-5354a 、B-5354b 及び／またはB-5354c を吸着させた後、メタノール水、アセトン水、n-ブタノール水などを用いて溶出させることにより得られる。このようにして得られたB-5354a 、B-5354b 及び／またはB-5354c は、更にシリカゲル、フロリジルのような担体を用いた吸着カラムクロマトグラフィー、セファデックスLH-20 （ファルマシア社製）などを用いた分配カラムクロマトグラフィー、セファデックスG-25 （ファルマシア社製）などを用いたゲルろ過クロマトグラフィー、及び順相、逆相カラムを用いた高速液体クロマトグラフィーで精製することができる。

【００３７】一方、B-5354c は化学的に合成する事により調製する事が出来る。すなわち、t-ブトキシカルボニル基、ベンジルオキシカルボニル基、Fmoc基のような保護基でアミノ基を保護した４－アミノ－３－ヒドロキシ安息香酸を塩化メチレン、ジメチルホルムアミドのような適当な溶媒中で、室温、あるいは必要があれば-20 ℃～0 ℃に冷却し、無触媒あるいはジメチルアミノピリジンのような触媒の存在下、Ｎ，Ｎ’－ジシクロヘキシルカルボジイミド（N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide:DCC ）やシアノリン酸ジエチル（ Diethylphosphorocyanide:DEPC ）のような縮合剤とともに７－テトラデセン－１－オールと反応させ、反応物を当業界周知の方法で脱保護反応に付すことによりB-5354c を調製することができる。

【００３８】本発明のB-5354a 、B-5354b 及び／またはB-5354c またはその塩を動脈硬化症、糖尿病、血栓症、炎症性疾患、自己免疫疾患、癌の進展や転移、経皮的冠動脈形成術(PTCA)後の再狭窄などの予防または治療剤として用いる場合、いろいろな形態で投与される。その投与形態としては例えば錠剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤、シロップ剤等による経口投与または注射剤（静脈内、筋肉内、皮下）などをあげることが出来る。これらの各種製剤は、常法に従って主薬に賦形剤、結合剤、崩壊剤、潤沢剤、溶解剤、矯味矯臭、コーティング剤等既知の医薬製剤分野において通常使用しうる既知の補助剤を用いて製剤化することができる。その使用量は症状、年齢、体重、投与方法および剤形等によって異なるが通常は成人に対して一日１０ｍｇ乃至１０００ｍｇを投与することができる。

【００３９】本発明の化合物B-5354a 、B-5354b 及び／またはB-5354c のスフィンゴシンキナーゼ阻害活性を測定する方法は以下の通りである（Schroepfer J. R. et al.,(1970) J Biol. Chem. 245, 3084-3090 参照）。

【００４０】即ち、まず、酵素溶液としてウイスターイマミチ系雄性ラットの細胞質可溶性画分を調製する。酵素溶液と、アデノシン三リン酸（以下「ATP 」という）、塩化マグネシウム、エチレンジアミン四酢酸（以下「EDTA」という）、メルカプトエタノールを含むリン酸カリウム緩衝液(pH7.4) 、検体溶液、およびプロピレングリコールに溶解した基質（[3-^{3}H]-D- エリスロ- スフィンゴシン (NEN 社製)を混合し、スフィンゴシンキナーゼ反応を開始させる。この反応は通常、37℃で保温することにより行う。一定時間経過後、濃アンモニア水を加えることにより反応を停止させ、クロロホルム：メタノール（２：１、vol/vol ）を加えて抽出操作を施し、得られた上層の放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定する。スフィンゴシンキナーゼ活性の算出は、上層に移行した放射活性の割合で示すことができる。即ち、基質の^{3}H- スフィンゴシンが^{3}H- スフィンゴシン-1-リン酸になり、有機層より水層に移行した割合を測定し、酵素活性を算出する。

【００４１】なお、スフィンゴシンキナーゼの活性測定は上記以外の方法として基質に放射性の^{32}P-ATP を用いるシュピーゲルらの方法（Olivera A. and Spiegel S., (1993) Nature , Vol. 365, 557-560 に記載）を用いても良い。

【００４２】

【実施例】次に実施例をあげて本発明を更に具体的に説明するが、本発明はこれに限定されない。

【００４３】実施例１ B-5354a 、B-5354b 及びB-5354c の生産

(1) 培養

SANK 71896株（FERM BP-5356)を無菌的に、滅菌した以下の組成の培養培地80mlを含む500ml の三角フラスコ（種フラスコ）に接種した。次いでこのものについて3日間、23℃で210rpmのロータリー振とう機で培養を行った。

【００４４】培地組成

グルコース	10g
バクトペプトン	10g
イースト・エクスラクト	1g
シュウ酸ナトリウム	1g
硫酸アンモニウム	1g
硫酸マグネシウム	1g
塩化第一鉄	0.002mg
硫酸マンガン	0.002mg

人工海水で1000mlとした。

【００４５】（pH 7.4：滅菌前）

(2) 単離

三角フラスコ 20 本分の培養液約 2リットルに等量のアセトンを加え 2 時間よく攪拌した。これを pH 3 に調製し、 2リットルの酢酸エチルで3 回抽出した。酢酸エチル層を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで脱水し、減圧濃縮して褐色油状物質 1g を得た。これを少量のヘキサン一酢酸エチル、4:1 の溶媒に溶解し、同じ溶媒で平衡化した200ml のシリカゲルカラムにチャージした。このカラムを 2リットルのヘキサン一酢酸エチル、4:1 の溶媒で溶出し、分画した。酵素阻害活性の認められた分画を濃縮したところ、415mg の淡黄色物質を得た。これを少量のメタノールに溶解し、以下のように調製用高速液体クロマトグラフィーで精製した。すなわち、約 20mg ずつ、アセトニトリル - 水 4:1 の溶媒で平衡化した高速液体クロマトグラフィーカラム（Senshu Pak, PEGASIL 20φX 60 mm 、センシュー科学（株）製）に供与し、同じ溶媒で、6 ml/ 分の流速で展開した。210 nm の吸収を検出し、約 10 分に溶出されるピーク（ B-5354a画分 ）、約 13 分に溶出されるピーク (B-5354b 画分）、約 15 分に溶出されるピーク（ B-5354c画分)をそれぞれ分取した。分取した画分を減圧濃縮して溶媒を留去したところ、B-5354a 、B-5354b 及び B-5354c の各画分をそれぞれ 12.2mg、5.8mg 、320 mg 得た。

【００４６】実施例２　B-5354cの化学合成

４－アミノ－３－ヒドロキシ安息香酸（東京化成製）1g を 50ml の塩化メチレンに懸濁し、5ml のピリジンおよび二炭酸ジ－tert－ブチル（株式会社ペプチド研究所製）3.7ml を加えて室温で 1 時間攪拌した。これに等量の水を加え分液ロートで分配し、下層を減圧濃縮してＮ－ブトキシカルボニル－４－アミノ－３－ヒドロキシ安息香酸を 1.5g 得た。一方、７－テトラデセン－１－イル・アセテート（アルドリッチ社製） 1g をメタノール中 1N の NaOH で加水分解して定量的に７－テトラデセン－１－オールを得た。Ｎ－ブトキシカルボニル－４－アミノ－３－ヒドロキシ安息香酸を 25mg 、 ７－テトラデセン－１－オール40mgを 1ml の塩化メチレンに溶解し更に 8mg のジメチルアミノピリジンを加えた。これを攪拌しながら、ジシクロヘキシルカルボジイミド（以下、「DCC 」という。）20mgを含む塩化メチレン溶液(1ml) を滴下した。DCC の滴下後薄層クロマトグラフィー（ n- ヘキサン－酢酸エチル 4:1で展開）で反応の進行をモニターしながら室温にて 2 時間攪拌を続けた。これに 2ml の水を加えて反応を終了し、減圧濃縮にて塩化メチレンを留去した後酢酸エチル抽出を 2 回行い更に酢酸エチル層を飽和食塩水で 2 回洗浄した。得られた抽出物を薄層クロマトグラフィーのプレートにチャージし n-ヘキサン－酢酸エチル 4:1で展開した。254nm の UV で検出し RF = 0.6 のスポットをかきとった。これを氷冷下トリフルオロ酢酸で処理して保護基をはずした。最終的な精製は天然物の分取と同様に行った。すなわちこの反応終了物を濃縮乾固し、アセトニトリル - 水 4:1 の溶液で平衡化した高速液体クロマトグラフィーカラム（Senshu Pak, PEGASIL 20φX 60 mm ）にチャージし、同じ溶媒で、6 ml/ 分の流速で展開した。210 nmの吸収を検出し、約 15 分に溶出されるピーク（ B-5354c ） を分取した。分取した溶液を減圧濃縮して溶媒を留去し、B-5354c を約 7 mg 得た。以上のように、収率 20 % で合成的な手法によって B-5354c を得た。

【００４７】試験例１　スフィンゴシンキナーゼ阻害活性の測定

(１) 酵素液の調製

スフィンゴシンキナーゼの酵素源としてラット肝臓を用い、まず以下のようにその細胞質可溶性画分を調製した。4 匹のウイスターイマミチ系雄性ラット（12週令）を頚動脈放血後、肝臓を摘出した。摘出した肝臓を0.15 M の塩化ナトリウム水溶液で軽く濯ぎ、細かくスライスした後、予め4 ℃に冷却した0.1 Mのリン酸バッファー(pH7.4)80ml を加え、4 ℃条件下、ポッターのホモジナイザーを用いて肝細胞の破砕を行った。次に、得られた細胞破砕液を4 ℃条件下、500 × g、15分の遠心分離を行い、上清を更に、4 ℃条件下、10,000 × gで30分間の遠心分離を行った。得られた上清を4 ℃条件下、105,000 × gで60分間の超遠心分離を行った。その上清を用いて更に硫安分画を行い、25%飽和から55%飽和の間で沈澱する画分を回収した。得られた沈澱を予め4 ℃に冷却したバッファーA （1mM EDTA、1mM メルカプトエタノール、20% グリセロールを含有する0.1M リン酸カリウム緩衝液、pH7.4 ：以下同様とする。）20mlに溶解した。その溶液をバッファーA 中で一晩透析し、得られた溶液を酵素溶液とした。この酵素溶液はスフィンゴシンキナーゼの活性測定時まで-80 ℃にて凍結保存し、使用時にバッファーA で蛋白質濃度0.5mg/mlになる様に調製

した。

【００４８】（２）酵素阻害活性の測定

スフィンゴシンキナーゼの阻害活性の測定は、シェファーらの方法（Schroepfer J. R. et al, (1970) J Biol. Chem. 245, 3084-3090 参照）に準じて、ラット肝臓細胞質可溶性画分を酵素源に、[3-^{3}H]-D- エリスロ- スフィンゴシン(NEN社製）を基質に用いて行った。即ち、先ず、酵素溶液（蛋白質濃度0.5 μg/ml）100 μl 、バッファーB （10mM ATP、20mM 塩化マグネシウム、1mM EDTA、１mMメルカプトエタノールを含有する０．１M リン酸カリウム緩衝液、pH7.4 ：以下、同様とする。）100 μl 、微生物より抽出した検体10 μl 並びにプロピレングリコールに溶解した基質(3-^{3}H-スフィンゴシン)10 μl を混合し、37℃で20分、インキュベートすることによりスフィンゴシンキナーゼ反応を行った。次に、濃アンモニア水50μl を加えることにより反応を停止させ、クロロホルム：メタノール（２：１、vol/vol）を750 μl 加えて抽出操作を施し、得られた上層70 μl を96穴プレート（ルーマプレート：パッカード社製）に加えて一晩放置し乾燥させた後、96穴プレート用液体シンチレーションカウンター（トップカウント：パッカード社製）にて放射活性を測定した。スフィンゴシンキナーゼ活性の算出は、上層に移行した放射活性の割合で示した。即ち、基質の ^{3}H-スフィンゴシンが ^{3}H-スフィンゴシン-1- リン酸になり、有機層より水層に移行した割合を測定し、酵素活性を算出した。なお、系に加えた基質は一定であるので、上層のみの放射活性を測定することにより酵素活性は算出される。

【００４９】この方法で測定した、スフィンゴシンキナーゼ反応を50％阻害するのに必要なB-5354a 、B-5354b 及びB-5354c の濃度はそれぞれ 9.0 μg/ml, 20.0 μg/ml, 25.0 μg/mlだった。

【００５０】

製剤例１　カプセル剤

処方

B-5354c	100 mg
乳糖	100 mg
トウモロコシ澱粉	148.8 mg
ステアリン酸マグネシウム	1.2 mg
全量	350 mg

【００５１】

【発明の効果】本発明のB-5354a 、B-5354b 及びB-5354c 化合物は、抗動脈硬化剤、抗糖尿病剤、抗血栓剤、抗炎症剤、免疫抑制剤、制癌剤、癌転移抑制剤、経皮的冠動脈形成術(PTCA)後の再狭窄等の予防または治療剤として有用である。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.^{6}	識別記号	ＦＩ	
Ａ６１Ｋ　31/245	ＡＥＤ	Ａ６１Ｋ　31/245	ＡＥＤ
// Ｃ１２Ｎ　9/99		Ｃ１２Ｎ　9/99	